

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A61K 9/16, 9/50	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/28143 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. September 1996 (19.09.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/00980 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. März 1996 (07.03.96) (30) Prioritätsdaten: 195 08 612.0 10. März 1995 (10.03.95) DE 195 13 659.4 11. April 1995 (11.04.95) DE 195 42 837.4 17. November 1995 (17.11.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOLL, Hans [DE/DE]; An der Bärenmühle 2, D-82362 Weilheim (DE). WINTER, Gerhard [DE/DE]; Jahnstrasse 20E, D-69221 Dossenheim (DE). KISSEL, Thomas [DE/DE]; Ketzerbach 63, D-35032 Marburg (DE). MORLOCK, Michael [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 5, D-68519 Viernheim (DE). (74) Anwälte: MINK, Reinhold usw.; Boehringer Mannheim GmbH, Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: POLYPEPTIDE-CONTAINING PHARMACEUTICAL FORMS OF ADMINISTRATION IN THE FORM OF MICROPARTICLES AND METHOD FOR THE PREPARATION THEREOF		
(54) Bezeichnung: POLYPEPTID-ENTHALTENDE PHARMAZEUTISCHE DARREICHUNGSFORMEN IN FORM VON MIKROPARTIKELN UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns polypeptide-containing parenteral pharmaceutical forms of administration in the form of microparticles, and a method for the preparation thereof. According to the invention, the microparticles contain as biodegradable polymer an ABA-tri-block copolymer whose A-block is a lactic and glycolic acid copolymer and whose B-block is a polyethyleneglycol chain, together with additives selected from the group comprising serum proteins, polyamino acids, cyclodextrins; cyclodextrin derivatives; saccharides; amino sugars; amino acids; detergents or carboxylic acids and mixtures of these additives. The microparticles according to the invention continuously release the polypeptide over a relatively long period of time even when the amounts of polypeptide they include are small or sensitive to aggregation.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Die Erfindung betrifft Polypeptid-enthaltende parenterale pharmazeutische Darreichungsformen in Form von Mikropartikeln und Verfahren zu deren Herstellung. Erfindungsgemäß enthalten die Mikropartikel als bioabbaubares Polymer ein ABA-Triblock-Copolymer, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt, zusammen mit Zuschlagstoffen, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyamino-säuren, Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide; Aminosucker; Aminosäuren; Detergenzien oder Carbonsäuren sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe. Die erfindungsgemäßen Mikropartikel setzen auch bei Einschluß geringer bzw. aggregationsempfindlicher Polypeptidmengen das Polypeptid über einen längeren Zeitraum kontinuierlich frei.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

5 **Polypeptid-enthaltende pharmazeutische Darreichungsformen in Form von**
10 **Mikropartikeln und Verfahren zu deren Herstellung**

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind parenterale pharmazeutische Darreichungs-
formen in Form von Mikropartikeln (MP) zur kontrollierten Freisetzung von Polypep-
10 tiden und Verfahren zur Herstellung dieser Mikropartikel.

Durch das schnelle Fortschreiten der Entwicklung in der Biotechnologie stehen eine
Vielzahl von bioaktiven Makromolekülen in ausreichender Menge zur klinischen An-
wendung zur Verfügung. Bedingt durch ihre Struktur werden sie im Magen-Darm-Trakt
15 hydrolytisch gespalten und können daher nur parenteral verabreicht werden. Wegen ihrer
kurzen Halbwertszeit ist die Entwicklung von parenteralen Depotsystemen sinnvoll, um
die Injektionshäufigkeit zu reduzieren und konstante Blutspiegel zu erreichen.

Es werden in der Fach- und Patentliteratur eine Reihe von Depotsystemen, insbesondere
20 mikropartikuläre Systeme, beschrieben, um physiologisch aktive Substanzen nach paren-
teraler Applikation über einen längeren Zeitraum hinweg möglichst konstant freizusetzen.
Dabei ist anzumerken, daß Proteine im Vergleich zu niedermolekularen Substanzen auf-
grund ihrer komplexen Struktur, ihres hohen Molekulargewichtes und dem - bedingt
durch ihre hohe biologische Wirksamkeit - geringen erforderlichen Beladungsgrad einige
25 Besonderheiten aufweisen, die eine erfolgreiche Mikroverkapselung erschweren. So kann
je nach Art der eingesetzten Mikroverkapselungsmethode die Proteinstabilität negativ
beeinflußt werden und die Freigabe nicht optimal bzw. mit unbefriedigendem Freigabe-
profil erfolgen. Das Freigabeverhalten wird einerseits durch das hohe Molekulargewicht
und die hydrophile Struktur, andererseits aber auch durch Stabilitätsprobleme (u.a.
30 Aggregation) des Proteins und dem niedrigen Beladungsgrad beeinflußt.

Eine der wichtigsten Herstellungsmethoden für Mikropartikel, wie zum Beispiel Mikro-
kapseln oder Mikrokugeln, ist das sogenannte "Tripelemulsionsverfahren", das auch
bereits zur Mikroverkapselung von Proteinen Anwendung gefunden hat. Grundsätzlich
35 wird bei dieser auch als W/O/W-Technik bezeichneten Methode der Wirkstoff in einer
wäßrigen Lösung gelöst bzw. suspendiert, und diese wäßrige Lösung mit einer das

Polymer enthaltenden "öiligen Lösung" aus einem organischen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel zu einer W/O-Emulsion homogenisiert. Diese W/O-Emulsion wird in eine wäßrige Stabilisator-haltige Lösung (äußere wäßrige Phase) dispergiert, so daß eine Emulsion mit drei Phasen (Tripelemulsion) entsteht. Mittels verschiedener
5 Techniken wird dann die Verdunstung des Lösungsmittels und damit eine Aushärtung der Mikropartikel erreicht. Die gehärteten Mikropartikel werden durch Zentrifugieren und/oder Filtrieren gesammelt und nach Waschen mit Wasser oder geeigneten wässrigen Lösungen und durch Lyophilisation oder Vakuumtrocknung bei Raumtemperatur getrocknet. Als Polymere werden in der Regel Polymere aus Milchsäure (LA = lactic acid)
10 und Glykolsäure (GA = glycolic acid) oder deren Copolymere (PLGA) mit Molekulargewichten zwischen 2.000 und 100.000 und einem Verhältnis von Milchsäure: Glykolsäure zwischen 100:0 bis 50:50 eingesetzt.

Als problematisch kann sich bei der Anwendung des Tripelemulsionsverfahrens der
15 Restlösungsmittelgehalt in den Mikropartikeln erweisen (R. Jalil und J.R. Nixon, J. Microencapsulation 7 (3), 1990, S. 297-325), da das als Polymerlösungsmittel am häufigsten verwendete Dichlormethan aus toxikologischer Sicht bedenklich erscheint. Aber auch aufgrund einer möglichen Beeinflussung der Polymer-Eigenschaften und der Wirkstoffstabilität in der Polymermatrix sollte der Restlösungsmittelgehalt möglichst
20 gering sein.

Die Herstellung von Mikrokapseln mit Hilfe des Tripelemulsionsverfahrens wird z.B. in der europäischen Patentanmeldung EP 0 145 240 (Takeda) offenbart, wobei dort die innere wäßrige Phase eine Viskosität von mindestens 5.000 mPas besitzt bzw. völlig verfestigt ist. Die Erhöhung der Viskosität erfolgt durch Hilfsstoffe wie Gelatine, humanes
25 Serumalbumin, Globulin, Casein, Collagen und Polyaminosäuren. In Anwendungsbeispielen wird die Mikroverkapselung von γ -Interferon bzw. Heparin beschrieben.

In der Patentschrift EP 0 190 833 (Takeda) wird das gleiche Herstellungsverfahren beschrieben, nur ist hier die Viskosität der W/O-Emulsion auf einen Wert zwischen 150 - 10.000 mPas einzustellen. Dies geschieht durch Variation der Polymer-Konzentration
30 (PLGA 100/0 - 50/50) und dem Zusatz von natürlichen oder synthetischen hochmolekularen Verbindungen, wie z. B. Proteinen, Kohlenhydraten (Cellulose, Dextrin, Pektin, Stärke, Agar), Polyvinylverbindungen, Polycarbonsäuren oder Polyethylenverbindungen in die wäßrige Phase. Dadurch soll eine stark verminderte Aggregations- und Kohäsionsneigung der Mikropartikel während der Herstellung erreicht werden. In einem
35 Anwendungsbeispiel wird Interferon alpha verkapselt.

In EP 0 442 671 (Takeda) werden bezüglich Aggregationsverhalten, sphärischer Gestalt der Mikropartikel und möglicher Zusätze ähnliche Angaben wie in EP 0 190 833 gemacht. "Arzneistoff-zurückhaltende Substanzen" sind gemäß Patentschrift nicht unbedingt erforderlich. Die in der Beschreibung näher erläuterten und konkret offenbarten Beispiele betreffen das kurzkettige und relativ stabile Peptid TAP144, das ein LHRH-Analogon darstellt.

Auch in der Fachliteratur sind Beispiele für die Mikroverkapselung von Peptiden bzw. Proteinen mit Hilfe der W/O/W-Technik publiziert.

So beschreiben Ogawa et al., (Chem. Pharm. Bull. 1988, Vol. 36, Nr. 3, S. 1095-1103) die Mikroverkapselung von Leuprorelinacetat, einem Peptid, unter der Verwendung von PLA (Polymer aus Milchsäure) bzw. PLGA und gehen auch auf das Freisetzungsverhalten des Peptids ein.

Cohen et al., (Pharmaceutical Research 1991, Vol. 8, Nr. 6, S. 713) verkapselten FITC-Meerrettich-Peroxidase und FITC-BSA in PLGA-Mikropartikeln mit einem Molekulargewicht von 14.000 oder weniger und einem Anteil Milchsäure/Glykolsäure von 75/25 und fanden sowohl eine Unversehrtheit des Proteins BSA als auch einen Erhalt der Enzym-Aktivität. Jeffery H. et al. (Pharmaceutical Research 1993, Vol. 10, Nr. 3, S. 362) benutzten Ovalbumin als Kernmaterial und konnten die Unversehrtheit des freigesetzten Proteins zeigen. M. S. Hora et al., (Biotechnology 1990, Vol. 8, S. 755) verwendeten Interleukin-2 und modifizierte Formen davon als Kernmaterial und untersuchten das Freisetzungsverhalten von PLGA-Mikropartikeln, die humanes Serumalbumin als Exzipiens enthielten.

Ferner wurden in verschiedenen Publikationen anhand von Modellschubstanzen für Proteine verschiedene Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln auf Basis der PLA- bzw. PLGA-Polymere und der Einfluß von Zuschlagstoffen auf die Proteinestabilität näher untersucht (vgl. W. Lu und G. Park, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology, 1995, 49: 13 - 19; M.-K. Yeh et al., Journal of Controlled Release, 1995, 33: 437 - 445; M. J. Alonso et al., Vaccine, 1995, 12: 299 - 306; J.P. McGee et al., Journal of Controlled Release, 1995, 34: 77-86). Als Modellproteine wurden hierbei Ovalbumin, Tetanus-toxoid und Carbo-Anhydrase untersucht.

Youxin L. et al. (Journal of Controlled Release 32, (1994) 121-128) beschreiben Depotformen aus ABA-Triblock-Copolymeren (MW:15 000-40 000), deren A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und deren B-Block eine Polyethylenglykol-Kette (PEG) darstellt. Sie stellten fest, daß diese Mikropartikel das für Aggregation relativ unempfindliche bovine Serumalbumin, das als Modellprotein bei hohem Beladungsgrad (ca. 3-4% w/w) eingesetzt wurde, schnell und kontinuierlich über 2-3 Wochen freisetzen (Polymerzusammensetzung LA:GA:PEG=48:14:38 [Mol%]).

Die im Stand der Technik zur Herstellung von Mikrokapseln bisher häufig verwendeten PLGA-Polymere weisen aufgrund ihres hydrophoben Charakters als entscheidenden Nachteil eine geringe Quellfähigkeit auf, wodurch der Wassereintritt in das Innere der Depotform nur langsam erfolgen kann. Dadurch ist eine Diffusion der Proteinmoleküle durch die Polymerschichten nur erschwert möglich, was eine unbefriedigende Freisetzungsrates zur Folge hat. Dies ist insbesondere beim Einschluß sehr geringer Polypeptidmengen, d.h. bei niedrigem Beladungsgrad, in die Mikropartikel der Fall. Außerdem bewirkt die langsame Wasseraufnahme wegen der geringen verfügbaren Wassermenge eine hohe lokale Proteinkonzentration, wodurch eine Bildung von hochmolekularen Proteinaggregaten gefördert wird. Diese können wiederum wegen ihres hohen Molekulargewichtes nicht mehr freigesetzt werden. Eine therapeutisch zuverlässige Dosierung des Wirkstoffes ist dann nicht mehr gewährleistet. Ferner kann es bedingt durch den hohen Anteil der Proteinaggregate zu unerwünschten immunologischen Reaktionen kommen. Nur sehr stabile Proteine mit relativ hohen Beladungsgraden von beispielsweise mehr als 5 % können mit akzeptabler Rate und ohne Bildung von Aggregaten über einen längeren Zeitraum hinweg freigesetzt werden.

Es zeigte sich ferner, daß auch hydrophile ABA-Triblock-Copolymere eine kontinuierliche Freisetzung von Polypeptiden über einen Zeitraum von zwei Wochen dann nicht gewährleisten können, wenn der Polypeptidgehalt in den Mikropartikeln sehr gering ist, d.h. wenn der Beladungsgrad niedrig ist. Ein niedriger Beladungsgrad liegt dann vor, wenn nur geringe Polypeptidmengen im Polymer eingeschlossen sind. Ein ähnliches nachteiliges Verhalten in der Freisetzung ist festzustellen, wenn aggregationsempfindliche Polypeptide verwendet werden. In diesen Fällen werden auch mit dem hydrophilen ABA-Triblock-Copolymer eine verstärkte Aggregatbildung und inakzeptable Freisetzungsdauern von weniger als zwei Wochen beobachtet. Dies führt insgesamt zu unbefriedigenden Freigabedauern des Wirkstoffes aus dem Polymer.

Aufgabe der Erfindung war es, Polypeptid-enthaltende Mikropartikel herzustellen, in denen die Aggregation des Wirkstoffes auch für aggregationsempfindliche Polypeptide möglichst gering gehalten bzw. weitgehend vermieden werden soll, und so das Polypeptid in einer möglichst unversehrten Form in den Mikropartikeln enthalten ist. Die Mikropartikel sollen eine kontinuierliche Freisetzung der Polypeptide über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen gewährleisten. Dies sollte vor allem bei solchen Mikropartikeln erzielt werden, die einen niedrigen Beladungsgrad an Wirkstoff aufweisen. Insbesondere sollten diese Freisetzungszeiträume für geringe Polypeptidmengen von bis zu etw 3 % (bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) gelten.

Daneben war es Aufgabe der Erfindung, ein Mikroverkapselungsverfahren bereitzustellen, mit dem diese gewünschten Mikropartikel herstellbar sind und das einen toxikologisch unbedenklichen Restlösungsmittelgehalt in den Mikropartikeln gewährleistet.

Die Aufgabe der Erfindung wird gelöst durch Mikropartikel, die aus einer bioabbaubaren Polymermatrix bestehen, in die das Polypeptid eingebettet ist, wobei als Polymer ein ABA-Triblock-Copolymer verwendet wird, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt, und die Zuschlagstoffe enthalten, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren, Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide, wie z. B. Di- und Polysaccharide; Aminozucker; Aminosäuren; Detergenzien; organische Carbonsäuren sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe.

Als Saccharide kommen beispielsweise die Disaccharide Trehalose, Saccharose, Maltose, in Frage. Polysaccharide sind beispielsweise Raffinose, Stärke, Maltodextrine, Alginate oder Dextran. Ein geeigneter Aminozucker ist beispielsweise das Chitosan. Ein bevorzugtes Cyclodextrinderivat im Sinne der Erfindung ist beispielsweise das Beta-Hydroxypropyl-Cyclodextrin (HPCD). Als Serumproteine kommen insbesondere Humanserumalbumin und bovines Serumalbumin in Frage.

Als organische Carbonsäuren kommen aliphatische und cyclische Monocarbonsäuren in Frage, beispielsweise Benzoesäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Valeriansäure, Acrylsäure, Crotonsäure sowie deren durch Hydroxygruppen substituierten Derivate, wie z.B. p-Hydroxybenzoesäure, β -Hydroxybuttersäure, Salicylsäure, Milchsäure oder Glykolsäure. Insbesondere eignet sich Benzoesäure. Die Carbonsäuren werden im Rahmen der Herstellung der Mikropartikel im wesentlichen der organi-

schen Phase (Polymerphase) zugesetzt, in der das Polymer gelöst oder suspendiert ist. Die zugesetzte Menge an Carbonsäuren bewegt sich im Bereich von bis zu 30 Gew.-%, bezogen auf die Menge der fertigen Mikropartikel, vorzugsweise bis zu 20 Gew.-%, insbesondere 1 - 15 Gew.-%. Die Verwendung von Monocarbonsäuren, wie z.B. Benzoe-
5 säure, als Zuschlagstoff bewirkt überraschenderweise eine Verbesserung der Freisetzung der Polypeptide aus den Mikropartikeln. Ein durch den Zusatz von Carbonsäuren zu erwartender beschleunigter Polymerabbau konnte dabei im Falle der ABA-Triblock-Co-polymere nicht festgestellt werden.

10 Vorteilhaft im Sinne der Erfindung sind auch Gemische der zuvor genannten Zuschlagstoffe. Beispielhaft seien erwähnt Gemische aus Dextranen und Polyaminosäuren. So sind z.B. Gemische aus Dextran und Poly-L-Arginin oder Dextran und Poly-L-Histidin besonders vorteilhaft in Bezug auf die Erniedrigung der Aggregatbildung des Poly-
15 dextrinen oder Cyclodextrinderivaten mit Aminosäuren oder Polyaminosäuren. Auch Detergenzien und Triglyceride wie beispielsweise Tween 20®, Tween 80®, Pluronic® oder Miglyol® sind als Zuschlagstoffe im Sinne der Erfindung geeignet.

Als Polyaminosäuren kommen sowohl die entsprechenden (D) oder (L) bzw. Poly-(D,L)-
20 aminosäuren in Frage. Besonders bevorzugt ist Polyarginin mit einem Molekulargewicht von 5.000 - 150.000, insbesondere 5.000 bis 50.000, sowie Polyhistidin mit einem Molekulargewicht von 5.000 - 50.000, insbesondere 15.000 - 50.000.

Mit den genannten erfindungsgemäßen Zuschlagstoffen ist es möglich, den Gesamt-
25 Aggregat-Anteil des Polypeptides unter 5% zu senken.

Als Polypeptide kommen im Sinne der Erfindung physiologisch aktive Polypeptide mit einem Molekulargewicht zwischen 2.000 bis 200.000 D in Frage. Vorzugsweise beträgt das Molekulargewicht mindestens 5.000, 10.000 oder 20.000 D. Insbesondere kommen
30 Polypeptide mit einem Molekulargewicht von bis zu 100.000, vorzugsweise bis zu 50.000 Dalton in Frage. Solche Polypeptide sind insbesondere biologisch aktive Makromoleküle, deren Muteine, Analoga, sowie Deletions- oder Substitutionsvarianten, die zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden können. Folgende Polypeptide werden beispielhaft
erwähnt: Erythropoietin (EPO), Parathormon (PTH), G-CSF, TNF, NGF oder EGF,
35 sowie deren durch Deletionen oder Substitutionen in der Aminosäurekette ableitbaren Derivate. Weitere Polypeptide sind: Interferone (α , β , γ - Interferon), Kolonie stimu-

5 lierende Faktoren, Interleukine, Makrophagen aktivierende Faktoren, B-Zell-Faktoren, T-Zell-Faktoren, Immunotoxine, Lymphotoxine, TGF, Thrombopoietin (TPO), Renin-Inhibitoren, Collagenase-Inhibitoren, EGF, Wachstumshormone, PDGF, Knochenwachstumsfaktoren, BMP (bone morphogenic proteins), Insulin, IGF-BP (insulin-like growth factor binding proteins), ANP (atrial natriuretic peptides), Calcitonin, FSH, LH, NGF, Glukagon, TSH (thyroid stimulating hormone), monoklonale oder polyklonale Antikörper. Besonders geeignete Polypeptide sind im Sinne der vorliegenden Erfindung aggregationsempfindliche Polypeptide, wie beispielsweise EPO.

10 Der Polypeptidgehalt in den Mikropartikeln beträgt zwischen 0,01 bis 5 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge. Bevorzugt beträgt der Beladungsgrad 0,1 - 3 Gew.-%, insbesondere 0,1 - 2 Gew.-%, und bevorzugt 0,1 - 1 Gew.-%. Insbesondere können Mikropartikel mit einem sehr geringen Beladungsgrad von bis zu 1 Gew.-% hergestellt werden. Für aggregationsempfindliche Proteine beträgt der bevorzugte Be-
15 ladungsgrad 0,1 - 1%, insbesondere 0,2 - 0,6 %. Als untere Grenze kommt ein Beladungsgrad von etwa 0,01; 0,05 bzw. 0,1 Gew.-% in Frage. Die Menge des in den Mikropartikeln enthaltenen Wirkstoffes ist abhängig von der in jedem Einzelfall zu bestimmenden Dosierung und der therapeutischen Breite des jeweiligen Wirkstoffes. Im Falle von EPO beträgt die Menge an Wirkstoff etwa 10 µg - 100 µg pro 10 mg Mikro-
20 partikelmenge. Insbesondere werden etwa 10 - 70 µg, bevorzugt 30 - 50 µg eingesetzt. Bei einer spezifischen Aktivität von EPO von etwa 160.000 U/mg entspricht dies einer Dosierung von 1.600 - 16.000 U pro 10 mg Mikropartikelmenge (10 - 100 µg pro 10 mg Mikropartikelmenge). Bevorzugt wird die zu verabreichende Mikropartikelmenge an der gewünschten Dosierung von EPO (in U) festgelegt. Wenn beispielsweise der Bela-
25 dungsgrad 0,4 % beträgt (entspricht 40 µg EPO pro 10 mg Mikropartikel) und die Dosierung von EPO 20.000 U (entspricht 125 µg EPO) betragen soll, ist eine Mikropartikelmenge von 31,25 mg zu verabreichen. Diese Menge entspricht einer voraussichtlichen Monatsdosis von EPO im DDS-System

30 Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Verwendung von ABA-Triblock-Copolymeren in Kombination mit Zuschlagstoffen eine kontinuierliche Freigabe der Polypeptide über einen längeren Zeitraum hinweg - mindestens jedoch zwei Wochen - ermöglicht, und durch die Zuschlagstoffe ein erheblicher aggregationsmindernder Effekt erreicht wird. Erfindungsgemäß kommen ABA-Blockpolymere in Frage, deren A-Block
35 ein Molekulargewicht zwischen 2.000 und 150.000 besitzt, und deren B-Block ein Molekulargewicht zwischen 1.000 und 15.000 besitzt. Insbesondere weist der B-Block

ein Molekulargewicht zwischen 3.000 bis 10.000 auf. Besonders bevorzugt sind ABA-Blockpolymere mit einem Molekulargewicht von 5.000 - 50.000 Dalton, vorzugsweise 10.000 - 30.000, und einer Polydispersität von 1,1 - 8,5 oder 1,1 - 5,5, vorzugsweise 1,5 - 4,5 und insbesondere bevorzugt von 2 - 4.

5

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die erfindungsgemäß verwendbaren ABA-Copolymere, die sich in ihrer Zusammensetzung bezüglich des Laktid/Glykolid/ PEG-Anteils, dem Molekulargewicht und der Polydispersität unterscheiden. Erfindungsgemäß beträgt der Polyethylenglykolanteil (PEG-Anteil) im Blockpolymer 20 bis 50 Mol-%, bezogen auf die Gesamtpolymermenge, vorzugsweise 25 bis 45 Mol-%. Als besonders vorteilhaft für die Freigabedauer und für die kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffes hat sich ein PEG-Anteil von 30 bis 40 Mol-%, insbesondere 30 bis 38 Mol-%, bevorzugt 30 bis 35 Mol-% erwiesen. Bevorzugt beträgt der prozentuale Gehalt von PEG im ABA-Blockcopolymer etwa 32 oder 33 Mol-%.

15

Der prozentuale Gehalt von LA im ABA-Blockcopolymer beträgt vorzugsweise 40 bis 60 Mol-%, insbesondere 45 - 60 Mol-%. Bevorzugt sind Molprozentage von etwa 46 %, 51 % oder 57 %. Der prozentuale Gehalt von GA im ABA-Blockcopolymer beträgt vorzugsweise 5 bis 25 %, insbesondere 10 bis 25 %. Bevorzugte Prozentangaben sind etwa 11 %, 16 % oder 22 %.

20

Das Verhältnis von Milchsäure zu Glykolsäure im Blockpolymer liegt zwischen 1:1 bis 5:1, insbesondere beträgt es zwischen 1,5:1 bis 4,5:1. Besonders bevorzugt ist ein Verhältnis LA/GA von etwa 2:1 bis 4 : 1. Erfindungsgemäß besonders bevorzugte ABA-Triblock-Copolymere sind Polymere mit einem Verhältnisanteil von LA/GA = 4 : 1 und einem Polyethylenglykolgehalt von 30-38 %. Insbesondere kommt ein Polymer mit einem Verhältnisanteil LA:GA:PEG = 57:11:32; 51:16:33; 50:12:38 oder 46:22:32 in Frage.

25

Die letztgenannten Polymermodifikationen bieten ein Optimum an Abbaugeschwindigkeit und PEG-Gehalt. Ein höherer PEG-Gehalt führt zwar zu einem noch schnelleren Abbau, andererseits aber auch zu einer Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften der Mikropartikel und möglicherweise auch zu Wechselwirkungen zwischen PEG und Polypeptid.

30

Die Herstellung der ABA-Triblock-Copolymere kann nach literaturbekannten Verfahren (s. Journal of Controlled Release 27, 1993, 247-257) durchgeführt werden.

35

Überraschend wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Zuschlagstoffe neben ihrem aggregationsmindernden Effekt eine signifikante Erhöhung der Freisetzungsdauer bewirken können, verglichen mit ABA-Mikropartikeln ohne Zuschlagstoffe. Dies gilt insbesondere für die erfindungsgemäßen Serumproteine, die eine Erhöhung der Freisetzungsdauer des Polypeptids auf beispielsweise bis zu 29 Tagen hervorrufen (vgl. Beispiel 4).
5 Als Serumproteine werden bevorzugt bovines oder humanes Serumalbumin eingesetzt. Werden die erfindungsgemäßen Zuschlagstoffe, insbesondere BSA und Beta-Hydroxypropyl-Cyclodextrin, PLGA-Mikropartikeln zugesetzt, so tritt ebenfalls ein aggregationsmindernder Effekt und somit eine Stabilisierung der aggregationsempfindlichen Polypeptide ein.
10

Derartig lange Freisetzungszeiträume von bis zu 29 Tagen sind von Polypeptiden aus Mikropartikeln auf Basis von PLGA oder ABA-Triblock-Copolymeren bislang nur bei hohem Beladungsgrad bekannt, jedoch nicht für solche Fälle, in denen die Wirkstoffmenge in den Mikropartikeln sehr gering ist, wie beispielsweise im Fall von EPO. Wird
15 EPO in einem höheren Beladungsgrad (z.B. ca. 3 %) in den ABA-Mikropartikeln eingeschlossen, wird das Protein über 29 Tage freigesetzt (s. Tab. 4 B). Insbesondere konnte festgestellt werden, daß eine verlängerte Freisetzung erzielt wird, wenn eine Monocarbonsäure, insbesondere Benzoesäure, der Polymerphase bei der Herstellung der Mikropartikel zugesetzt wird. Dies gilt insbesondere im Fall der zuvor genannten
20 niederen Beladungsgraden.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel können als Zuschlagstoffe auch Aminosäuren wie z.B. Arginin, Glycin, Lysin oder Phenylalanin, Cyclodextrine oder Cyclodextrinderivate
25 wie z.B. Beta-Hydroxypropyl-Cyclodextrin (HPCD) enthalten. Ebenso können erfindungsgemäß als Zuschlagstoffe Polyaminosäuren wie z.B. Polyarginin oder Polyhistidin eingesetzt werden oder auch Gemische aus Cyclodextrinen oder Cyclodextrinderivaten mit Aminosäuren oder Polyaminosäuren wie z.B. HPCD mit Polyarginin. Auch Gemische aus Dextranen mit Cyclodextrinderivaten, z.B. mit HPCD, oder mit Cyclodextrinen
30 finden Verwendung. Die verwendeten Dextrane besitzen ein Molekulargewicht zwischen 20.000 und 60.000, besonders bevorzugt ist Dextran 40.000.

Neben den Serumproteinen werden erfindungsgemäß als Zuschlagstoffe Gemische aus Dextranen und Polyarginin oder Gemische aus Dextranen und Polyhistidin besonders
35 bevorzugt eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel enthalten die Zuschlagstoffe in einer Menge von 0,5 - 40 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, vorzugsweise von 1 - 30%. Insbesondere bevorzugt sind 1 - 20 Gew.-%. Im Fall der Saccharide werden vorzugsweise Mengen von 5 - 15 Gew.-% eingesetzt. Im Fall der Polyaminosäuren beträgt die Menge der Zuschlagstoffe insbesondere 1 - 5 Gew.-%. Cyclodextrin und Cyclo-
5 dextrinderivate werden vorzugsweise in einer Menge von 2 - 20 Gew.-% zugesetzt. Die Menge an BSA oder HSA beträgt bevorzugt 2 - 20 Gew.-% bezogen auf das Gesamtpartikelgewicht. Die Menge an Carbonsäuren beträgt insbesondere bis zu 15 %, bevorzugt etwa 10 %.

10

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von Polypeptid enthaltenden Mikropartikeln mit Hilfe des Tripelemulsionsverfahrens, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das bei der Herstellung der "öiligen" bzw. organischen Phase durch Lösen eines Polymers in einem organischen, nicht wassermischbaren Lösungsmittel als Polymer ein
15 ABA-Triblock-Copolymer eingesetzt wird, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt und dem wäßrig gelösten Polypeptid, das in der organischen Phase emulgiert wird, Zuschlagstoffe zugesetzt werden, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren, Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide, wie z. B. Di- und Polysaccharide;
20 Aminosucker; Aminosäuren; Detergenzien oder Carbonssäuren sowie deren Gemische.

Es hat sich gezeigt, daß der erste Homogenisierungsschritt (Bildung der W/O-Emulsion) offensichtlich für die Bildung von Polypeptid-Aggregaten besonders verantwortlich zu sein scheint. Erfindungsgemäß wurde deshalb die Dispergierzeit von 60 auf 30 Sekunden
25 verkürzt, als Homogenisator ein Ultra-Turrax eingesetzt und das Gewichtsverhältnis Wasser/organische Phase (bevorzugt Dichlormethan) von 5 auf bis zu 20 % (Gewichtsprozent) erhöht. Vorzugsweise wird im ersten Homogenisierungsschritt zweimal etwa 30 Sekunden, mit einer Pause von etwa 30 Sekunden, dispergiert. Besonders vorteilhaft wird einmal etwa 30 Sekunden lang dispergiert. Durch diese Modifizierung
30 der Herstellungsbedingungen konnte eine leichte Abnahme des Aggregatanteils erreicht werden.

Im Sinne des erfindungsgemäßen Herstellverfahrens ist es besonders vorteilhaft, wenn während des Herstellungsprozesses alle Lösungen und Geräte während der gesamten
35 Herstdauer auf 0 - 6 °C gekühlt werden. Hierdurch wird eine besonders günstige Aggregatreduktion des Proteins erzielt. Es ist in diesem Fall sogar möglich, auf den

Zusatz von aggregationshemmenden Zuschlagstoffe weitgehend zu verzichten. Im Vergleich zur Herstellung der Mikropartikel bei Raumtemperatur konnte auf diese Weise eine deutliche Reduzierung des Aggregatgehaltes der verwendeten Polypeptide in den Mikropartikeln erreicht werden (Reduktion von 10 - 20 % Aggregatgehalt auf einen
5 Aggregatgehalt von 2 - 5 %).

Das Gewichtsverhältnis Wasser/organische Phase von 20-25 % (3 -4 Teile organisches Lösungsmittel/ein Teil Wasser) ermöglicht außerdem das Einbringen einer größeren Menge von Zuschlagstoffen in die innere wäßrige Phase.

10 Die erfindungsgemäßen Mikropartikel besitzen überraschenderweise auch einen äußerst geringen Restlösungsmittelgehalt. Die mit ABA-Polymer hergestellten Mikropartikel enthalten weniger als 1 %, vorzugsweise weniger als 0,1 %, insbesondere weniger als 0,01 % Restlösungsmittel, wie z.B. Dichlormethan. Offensichtlich wurde durch die
15 gewählten Prozeßparameter eine nahezu vollständige Entfernung des Dichlormethans aus den entstehenden Mikropartikeln erreicht, was vor allem auf das günstige Volumen-Verhältnis der organischen zur äußeren wäßrigen Phase zurückzuführen ist.

Um den Einfluß von Restwasser auf die Proteinstabilität auszuschließen, wurde auch der
20 Restwassergehalt in den Mikropartikeln bestimmt. Der ermittelte Wassergehalt von 0,2% zeigte, daß der Wasseranteil der eingesetzten inneren wässrigen Phase fast vollständig entfernt werden konnte.

Untersuchungen zur Lagerstabilität der erfindungsgemäßen Mikropartikel haben gezeigt,
25 daß diese mindestens 2 Monate bei Raumtemperatur (20-25°C) lagerstabil sind und keine Veränderungen hinsichtlich der Aggregat-Bildung und dem Freisetzungsverhalten auftreten.

30 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung von pharmazeutischen Zuschlagstoffen ausgewählt aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren; Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide; Aminozucker; Aminosäuren; Detergenzien sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe zur Vermeidung der Aggregatbildung von aggregationsempfindlichen Polypeptiden bei der Herstellung von Polypeptid-enthaltenden Mikropartikeln.

35 In den folgenden Ausführungsbeispielen wird die Erfindung näher erläutert, ohne sie darauf zu beschränken.

Beispiel 1:**Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln enthaltend EPO (W/O/W-Methode)**

- 5 Ein D,L-PLGA-Polymer (LA:GA=50:50; RG503) wurde von Boehringer Ingelheim bezogen und ein ABA-Copolymer (LA:GA:PEG=50:12:38) wurde wie in "Journal of Controlled Release 27, 1993, 247-257" beschrieben, hergestellt.

- 10 Es wurde je eine Lösung aus dem D,L-PLGA- und ABA-Block-Polymer in Dichlormethan hergestellt, indem 700 mg des Polymers in 2,5 ml (3,3 g) Dichlormethan gelöst wurden. 3,5 mg EPO (in 0,2 ml Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4) werden je nach Bedarf mit Zuschlagstoffen (1 % - 20 Gew.% bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) versetzt und mit Wasser auf 0,8 ml (0,8 g) Endvolumen aufgefüllt.

- 15 Die wäßrige EPO-Lösung wird zur Polymerlösung gegeben und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (30 Sekunden, 30s Pause, erneut 30s, 20-24°C, 20.000 U bzw. einmal für 30 Sekunden) eine W/O-Emulsion hergestellt. Anschließend wird die W/O-Emulsion durch Einspritzen in 300 ml wäßrige 0,1 % PVA-Lösung mit Hilfe eines Ultra-Turrax bei 8000 U/min für 30 Sekunden dispergiert (Herstellung einer W/O/W-Tripelemulsion).

- 20 Die W/O/W-Emulsion wird zur Verdunstung der organischen Dichlormethanphase für 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Flügelrührers gerührt (solvent evaporation). Die gebildeten und gehärteten MP werden durch Abnutschen isoliert, zweimal mit je 200 ml Wasser gewaschen und lyophilisiert. Die Mikropartikel werden in
25 einem Exsikkator über Blaugel bei 4 °C - 8°C gelagert.

Beispiel 2:

- 30 **Stabilisierung von EPO-haltigen Mikropartikeln**

Es wurden nach herkömmlichen Methoden, wie in Beispiel 1 beschrieben, Mikropartikel hergestellt, wobei unterschiedliche Zuschlagstoffe in unterschiedlichen Mengen, bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, eingesetzt wurden.

Die Aggregatbildung des Wirkstoffes EPO wurde anschließend mittels SDS-PAGE nach der Extraktion von EPO aus den Mikropartikeln (a) oder der Solvation der Mikropartikel in DMSO oder DMSO/DMF-Gemisch (30:70) (b) folgendermaßen bestimmt:

5 a) 10 mg MP wurden in 300 µl CH₂Cl₂ gelöst und EPO durch Zugabe von 700 µl Aceton ausgefällt. Das EPO-Präzipitat wurde abzentrifugiert, 2x mit 1 ml CH₂Cl₂/Aceton-Gemisch (1:3) gewaschen und anschließend in der speed vac getrocknet. Der Niederschlag wurde in Probenpuffer für SDS-PAGE (Zusammensetzung: 60 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS; 10 %
10 Glycerin; 0,001 % Bromphenolblau) gelöst, auf ein 12,5 oder 15%-iges SDS-Gel geladen und einer Elektrophorese unterzogen.

b) 10 mg MP wurden in 200 µl DMSO/DMF (30:70) gelöst. 25 µl (entspricht ca. 5 µg EPO) wurden direkt auf ein 15 %-iges SDS-Gel geladen und einer
15 Elektrophorese unterzogen.

Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele entweder:

aa) mit Coomassie angefärbt und mittels eines Laserscanners
densitometrisch vermessen, oder

bb) auf Nitrocellulose geblottet, mittels eines EPO-spezifischen Antikörpers
20 die EPO-haltigen Banden angefärbt und mittels eines Laserscanners
densitometrisch vermessen.

Es zeigte sich, daß in ABA-Mikropartikeln (LA:GA:PEG = 50:12:38) der EPO-Gesamt-Aggregat-Anteil von ca. 15-30% durch den Einschluß von BSA auf unter
25 1% verringert werden konnte. Weiterhin zeigten Poly-L-Arginin bzw. Poly-L-Histidin, auch in Kombination mit Dextran 40.000 eine deutliche Aggregat-reduzierende Wirkung. Diese Zuschlagstoffe wurden in einer Menge von 1 bis 10 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, eingesetzt (vgl. Tabelle 1).

30 Auch in EPO-PLGA-Mikropartikeln wird durch Zuschlagstoffe eine Aggregat-Reduzierung erreicht. Hier erwiesen sich insbesondere BSA und β-Hydroxy-Propyl-Cyclodextrin als äußerst wirkungsvoll (Aggregatanteil unter 1%) (vgl. Tabelle 2). In den Mikropartikeln mit PEG als Zuschlagstoff wurde dagegen ein Anstieg des Aggregatanteils festgestellt. Daneben wurde bei PEG bzw. Pluronic F127 haltigen

Mikropartikeln mit mindestens 4% Hilfsstoffanteil ein vermehrtes Auftreten deformierter Mikropartikel beobachtet.

Tabelle 1: Zuschlagstoffe und ihr Einfluß auf die Aggregat-Situation

5

Zuschlagstoff	% ww vom Gesamt- partikel	Aggregation ↑ = erhöht - = unverändert ↓ = erniedrigt
ohne (Raumtemperatur)		10 - 20 %
ohne (0 - 4 °C)		↓
bovines Serumalbumin	5	↓↓↓
bovines Serumalbumin	10	↓↓↓
Dextran 40.000	5	↓
Dextran 20.000	5	-
Poly-L-Arginin	1-5	↓↓
Poly-L-Histidin	1-5	↓↓
Poly-L-Arginin	2,5	↓
β-Hydroxypropyl-Cyclodextrin	2,5	
Dextran 40.000	2,5	↓↓
β-Hydroxypropyl-Cyclodextrin	2,5	
Poly-L-Arginin	1-5	↓↓
Dextran 40.000	5	
Poly-L-Histidin	1-5	↓↓
Dextran 40.000	5	
β-Hydroxypropyl-Cyclodextrin	5-15	↓
Arginin	5	↓
Benzoessäure	10	-
Tween 20	0,5	↓
Pluronic F68	0,5	↓
Pluronic F127	0,5	↓
Zum Vergleich:	Δ	↑↑
100 mM Na-Phosphat	15	

Tabelle 2:

Zuschlagstoffe und ihr Einfluß auf die Aggregat-Situation in PLGA-Mikropartikeln

5

Zuschlagstoff	% ww vom Gesamt- partikel	Aggregation ↑ = erhöht - = unverändert ↓ = erniedrigt	initialer Burst [%]
ohne		8 – 10 %	29
BSA	5	↓↓	40
BSA	10	↓↓	40
CD	5	↓↓	30
CD	10	↓↓	40
CD	15	↓↓	40
CD/PEG 10.000	5/5	↓	7
CD/Pluronic F127	5/5	↓	8
CD/Trehalose	5/5	↓	30
Dextran 40.000	5	↓	10
D40/Poly-(L)-Arginin	5/1	↓	n.b.
Arginin	0,2	↓	15
Arginin	4,8	↓	18
PEG 1.550	0,43	–	12
PEG 1.550	4,3	↑	1.3
PEG 10.000	10	↑	0.6
PEG 35.000	10	↑	n.b.
Pluronic F127	10	↓	20

n.b. : nicht bestimmt

Beispiel 3:**Einfluß von Zuschlagstoffen auf die Freisetzung von EPO aus PLGA-Mikropartikeln**

- 5 Es wurden Mikropartikel auf Basis von D,L-PLGA-Polymeren (RG503, MG= 40 000; LA:GA= 50:50; Polydispersität 2,4) mit einem Wirkstoffgehalt von EPO von 0,5 % (bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) gemäß Beispiel 1 hergestellt, wobei bei der Herstellung unterschiedliche Zuschlagstoffe (% w/w bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) eingesetzt wurden.

10

Die Bestimmung der Freisetzungsrates (in % der verkapselten Wirkstoffmenge/pro Tag) erfolgte folgendermaßen:

- Jeweils 15 mg Mikropartikel wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen eingewogen und mit 1,5 ml PBS-Puffer und 0,01 % Tween 20, pH 7,4 versetzt. Diese Röhrchen wurden in einem auf 37 °C thermostatierten, rotierenden Metallblock (Rotatherm, Fa. Liebisch, 30 U/Min.) gestellt. Nach den vorgegebenen Probenahmezeiten wurden die Proben gezogen und das verbleibende Freigabemedium jeweils vollständig durch neues Medium ausgetauscht. Es wurden die Freisetzungsrates für folgende Mikropartikel bestimmt:

20 **Tabelle 3**

In vitro Freisetzung von EPO aus PLGA (50:50) - Mikropartikeln

Freisetzung in % / Tag (bezogen auf die in den MP vorhandene EPO-Gesamtmenge)

25

Tag:	1	2	3	7	11	14	18	21	25	29
Zuschlagstoff										
ohne	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 % BSA	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 % HPCD	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 % Arg	19	0,1	0,05	-	-	-	-	-	-	-
5 % Dextr 40	9,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
5 % Dextr 40 1 % Polyarg	5,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-

	Dextr 40:	Dextran 40.000
	Polyarg:	Polyarginin
	Arg:	Arginin
	HPCD:	β -Hydroxypropyl-Cyclodextrin
5	BSA:	bovines Serumalbumin

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, daß in PLGA-Mikropartikeln unabhängig von den Zusatzstoffen die EPO-Freisetzung nur maximal 24-36 Stunden andauert und dann keine
10 weitere kontinuierliche Freisetzung erfolgt. Durch die Zuschlagstoffe wird lediglich die Höhe des initialen Burst verändert. Eine protahierte Freigabe des EPO konnte mit den Zuschlagstoffen nicht erreicht werden.

15 **Beispiel 4:**

Einfluß von Zuschlagstoffen auf die Freisetzung von EPO aus ABA-Mikropartikeln

Es wurden Mikropartikel auf Basis von ABA-Triblock-Copolymeren mit
20 LA:GA:PEG=57:11:32 (Polymer A) und LA:GA:PEG=50:12:38 (Polymer B) mit einem Wirkstoffgehalt von EPO von jeweils 0,5 Gew.-% (bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) gemäß Beispiel 1 hergestellt, wobei unterschiedliche Zuschlagstoffe (% w/w bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge) eingesetzt wurden. Die Bestimmung der Freisetzungsraten wurde wie in Beispiel 3 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse
25 sind in Tabelle 4 A zusammengefaßt. Die Polymere A und B waren hinsichtlich des Freisetzungsverhaltens des Wirkstoffes qualitativ weitgehend vergleichbar.

Tabelle 4 A:

In vitro Freisetzung von EPO aus ABA Mikropartikeln (bei 0.5% Beladungsgrad)
Freisetzung in % / Tag (bezogen auf die in den MP vorhandene EPO-Gesamtmenge)

5

Tag:	1	2	3	7	11	14	18	21	25	29
Zuschlagstoff										
ohne	12,7	1,8	0,5	0,26	0,02	-	-	-	-	-
5 % BSA	4,6	1,6	0,5	0,4	0,12	0,06	0,07	0,04	0,03	0,04
10 % BSA	3,7	1,6	0,4	0,4	0,25	0,14	0,11	0,08	0,04	0,04
5 % Dextr 40	9,0	1,1	n.d.	0,85	0,3	0,22	0,1	-	-	-
5 % Dextr 40 1 % Polyarg	17,0	3,0	n.d.	2,8	1,3	0,34	0,17	-	-	-
10% Benzoesäure*	18,4	3,9	3,4	2,5	1,3	0,7	0,2	0,1	-	-
10 % HPCD	23,2	3,1	2,0	1,2	0,5	0,12	0,07	-	-	-
5 % Arg	38	4,5	3,5	0,7	0,3	0,03	0,02	-	-	-

Dextr 40: Dextran 40 000
 Polyarg: Polyarginin
 Arg: Arginin
 HPCD: β -Hydroxypropyl-Cyclodextrin
 BSA: bovines Serumalbumin
 n.d. nicht bestimmt
 * Zuschlagstoff in die Polymerphase gegeben

15

Aus Tabelle 4 A wird deutlich, daß im Gegensatz zu den PLGA-Mikropartikeln bei den ABA-Mikropartikeln eine kontinuierliche Freisetzung von EPO bis beispielsweise zum 29. Tag erzielt werden kann, insbesondere bei der Verwendung von BSA als Zuschlagstoff.

20

Vergleicht man die in vitro Freisetzung von EPO aus PLGA (50:50) - Mikropartikeln und ABA-Mikropartikeln verschiedener Monomierzusammensetzungen mit einem Wirkstoffgehalt von 0,5 % bzw. 3,4 % - jeweils ohne Zusatzstoffe - so wird die Überlegenheit der erfindungsgemäßen ABA-Mikropartikel deutlich:

25

Tabelle 4 B:

Vergleich der In vitro Freisetzung von EPO aus PLGA- und ABA-Mikropartikeln mit unterschiedlichen Monomerzusetzungen bzw. unterschiedlichen Beladungsgrad ohne weitere Zusatzstoffe

Freisetzung in % / Tag (bezogen auf die in den MP vorhandene EPO-Gesamtmenge)

Tag:	1	2	3	7	11	14	18	21	25	29
MP aus Polymer Beladungsgrad (in %)										
PLGA (50:50) (0,5%)	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABA (57:11:32) (0,5%)	12,7	1,8	0,5	0,26	0,02	-	-	-	-	-
ABA (51:16:33) (0,5%)	31	n.b.	1,6	0,7	0,4	0,1	-	-	-	-
ABA (46:22:32) (0,5%)	15	n.b.	3,2	1,0	0,5	0,2	0,1	-	-	-
ABA (51:16:33) (3,4%)	11,7	2,2	1,8	0,8	0,2	0,17	0,2	0,2	0,13	0,1

n.b. = nicht bestimmt

10

Aus der Tabelle 4 B ist zu entnehmen, daß bei geringem Beladungsgrad (0,5 %) die Freisetzung aus ABA-Mikropartikeln auf 11-18 Tage begrenzt ist, wenn keine Zuschlagstoffe zugesetzt werden. Im Falle der ABA-Triblock-Copolymeren ist im Verhältnis zu den PLGA-Mikropartikeln bei gleichem Beladungsgrad eine verlängerte Freisetzungsdauer festzustellen. Die Freisetzungsdauer verlängert sich bei einem höheren Gehalt von GA im ABA-Triblock-Copolymeren (s.o. längere Freisetzung bei steigendem Gehalt von GA von 11, 16 bzw. 22 Gew.-%).

15

Beispiel 5:

In der folgenden Tabelle 5 werden die chemischen und physikalischen Eigenschaften einiger ABA-Blockpolymere in einer Übersicht zusammengestellt.

5

Tabelle 5:

Übersicht der verwendeten ABA-Triblock-Copolymere

Charge	LA/GA/PEG %	MW [Da]	Tg [°C]	Polydispersität
1	64/13/23	25.000	47.9	3.1
2	57/11/32	19.000	46.3	2.5
3	50/12/38	20.000	46.1	2.3
4	45/9/46	17.000	42.1	2.8
5	36/35/29	16.400	35.3	6.8
6	46/22/32	16.700	45.1	5.4
7	42/28/30	17.200	31.1	8.4
8	51/16/33	18.500	47.9	4.6
9	40/20/40	13.500	23.7	5.2

10

Die aus den in Tab. 5 angegebenen ABA-Triblock-Copolymeren hergestellten EPO-haltigen MP wiesen Glasübergangstemperaturen (Tg) im Bereich von 27-45°C auf. Damit ist eine langfristige stabile Lagerung der MP im Kühlschrank (4-8°C) möglich.

15

Beispiel 6:

Herstellung von Mikropartikeln unter Kühlung zur Reduktion der Aggregatbildung

20

Die Herstellung der Mikropartikel erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben mit folgenden Änderungen:

Alle Lösungen (Dichlormethan-Polymer-Lösung, EPO-Lösung in Natrium-Phosphat-Puffer und PVA-Lösung) wurden in einem Eisbad (0 °C) im Kühlraum vorgekühlt. Alle

Gefäße und Geräte (z.B. Ultrathurrax) wurden im Kühlraum (4 °C) vorgekühlt. Alle Schritte zur Herstellung der Mikropartikel, inklusive des Rührens der w/o/w-Emulsion zur Härtung der Mikropartikel und zur Evaporation des Dichlormethans wurden im Eisbad im Kühlraum durchgeführt. Die Messung der Temperatur in der 0,1 %igen PVA-Lösung nach Herstellung der w/o/w-Emulsion ergab 1 °C.

Die so hergestellten Mikropartikel hatten folgende vorteilhaften Eigenschaften: Der praktische Beladungsgrad von EPO war größer als beim Standardverfahren (0,54 % statt 0,4 %). Der Aggregatgehalt in Mikropartikeln ohne stabilisierende Zuschlagstoffe war geringer (2 - 5 % statt 10 - 20 %). Der Aggregatgehalt wurde dabei analog dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren bestimmt.

Abkürzungsverzeichnis:

15

MP:	Mikropartikel
PLGA:	Copolymer aus Milchsäure und Glykolsäure
LA:	Milchsäure (lactic acid)
GA:	Glykolsäure (glycolic acid)
20 ABA:	Tripel-Blockcopolymer aus A- und B-Block
A-Block:	Copolymer aus Milch- und Glykolsäure
B-Block:	Polyethylenglykol (PEG)

25

BSA:	bovines Serumalbumin
HSA	humanes Serumalbumin
PVA	Polyvinylalkohol
D40	Dextran 40.000

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Darreichungsformen in Form von Mikropartikeln bestehend aus
5 einer einen Wirkstoff enthaltenden Polymermatrix, wobei das Polymer ein ABA-
Triblock-Copolymer ist, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykol-
säure und dessen B-Block eine Polyethylenglykol-Kette darstellt, dadurch
gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein aggregationsempfindliches Polypeptid ist
und die Mikropartikel Zuschlagstoffe enthalten, die ausgewählt sind aus der
10 Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren, Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate;
Saccharide; Amino Zucker; Aminosäuren; Detergenzien oder Carbonsäuren sowie
Gemische dieser Zuschlagstoffe.
2. Pharmazeutische Darreichungsformen gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-
15 zeichnet, daß die Zuschlagstoffe ausgewählt sind aus der Gruppe Serumalbumin;
Polyaminosäuren; Aminosäuren; Saccharide; Cyclodextrinderivate und
Detergenzien.
3. Pharmazeutische Darreichungsformen gemäß Anspruch 1, dadurch gekenn-
20 zeichnet, daß die Zuschlagstoffe ausgewählt sind aus Gemischen von Dextranen
und Polyaminosäuren; Gemischen aus Cyclodextrinen oder Cyclodextrinderivaten
mit Aminosäuren; Gemischen von Cyclodextrin oder Cyclodextrinderivaten mit
Polyaminosäuren; Gemischen von Cyclodextrinen oder Cyclodextrinderivaten mit
Dextranen; oder aus Gemischen von Dextranen mit Aminosäuren.
25
4. Pharmazeutische Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch
gekennzeichnet, daß als Zuschlagstoffe in der Polymerphase Carbonsäuren
enthalten sind.
- 30 5. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekenn-
zeichnet, daß das ABA-Blockpolymer ein Molekulargewicht zwischen 5.000
bis 50.000 Dalton, vorzugsweise zwischen 10.000 bis 30.000, aufweist.
6. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekenn-
35 zeichnet, daß der Polyethylenglykolanteil im ABA-Copolymer zwischen 20 bis

50 Gew.-%, bezogen auf die gesamte Polymermenge, vorzugsweise zwischen 30 bis 40 Gew.-% liegt.

- 5 7. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis von Milchsäure zu Glykolsäure im ABA-Copolymer zwischen 1:1 bis 5:1 liegt, vorzugsweise zwischen 1,5:1 bis 4,5:1.
8. Darreichungsformen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis von Milchsäure zu Glykolsäure etwa 4 : 1, vorzugsweise 2 : 1
10 beträgt.
9. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuschlagstoffe in einer Menge von 0,5 bis 40 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, vorzugsweise von 1 - 30 Gew.-%,
15 % enthalten sind.
10. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Polyaminosäuren Polyarginin oder Polyhistidin, insbesondere Poly-L-Arginin oder Poly-L-Histidin, enthalten, als Aminosäuren
20 Arginin, Glycin, Phenylalanin, Glutaminsäure oder Lysin enthalten, als Saccharide, Trehalose, Saccharose, Maltose, Stärke, Maltodextrine, Raffinose, Alginat, Dextrane enthalten, als Aminosucker Chitosan oder als Detergenzien oder Triglyceride Tween 20[®], Tween 80[®], Pluronic[®] oder Miglyol[®] enthalten.
25
11. Darreichungsformen gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Dextrane solche mit einem Molekulargewicht zwischen 20.000 und 60.000, vorzugsweise 40.000, enthalten.
- 30 12. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Zuschlagstoffe Gemische aus Dextranen mit Polyarginin oder Polyhistidin enthalten, vorzugsweise Gemische aus Dextran 40.000 mit Poly-L-Arginin oder Gemische aus Dextran 40.000 mit Poly-L-Histidin.

13. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Zuschlagstoffe Serumproteine enthalten, vorzugsweise bovines oder humanes Serumalbumin.
- 5 14. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Polypeptidgehalt in den Mikropartikeln zwischen 0,01% bis zu 5 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmikropartikelmenge, vorzugsweise zwischen 0,01% bis zu 3 Gew.-% beträgt.
- 10 15. Darreichungsformen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie Erythropoietin als Polypeptid enthalten.
16. Verfahren zur Herstellung von Polypeptid-enthaltenden Mikropartikeln mit Hilfe des Tripelemulsionsverfahrens, umfassend die Schritte:
- 15 a) Lösen eines ABA-Triblock-Copolymeren, dessen A-Block ein Copolymer aus Milch- und Glykolsäure ist und dessen B-Block ein Polyethylenglykol-Kette darstellt, in einem organischen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel, gegebenenfalls unter Zusatz einer Carbonsäure;
- b) Zugabe einer Lösung oder einer Suspension eines Polypeptides, wobei die
20 Lösung oder Suspension weitere Zuschlagstoffe enthält, die ausgewählt sind aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren; Cyclodextrine; Cyclo-dextrinderivate; Saccharide; Aminosucker; Aminosäuren, Detergenzien sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe, und Herstellung einer W/O-Emulsion in einem ersten Homogenisierungsschritt;
- 25 c) Herstellen einer W/O/W-Emulsion in einem zweiten Homogenisierungsschritt durch Dispersion der erhaltenen W/O-Emulsion in einer Stabilisator-haltigen wässrigen Lösung; und
- d) Verdunsten des Lösungsmittels und anschließender Isolierung der Mikro-
partikel.
- 30 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß im ersten Homogenisierungsschritt als Homogenisator ein Ultra-Turrax eingesetzt wird und einmal 30 Sekunden oder zweimal 30 Sekunden, mit einer Pause von 30 Sekunden dazwischen, dispergiert wird.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gewichtsverhältnis Wasser/organische Phase von bis zu 20 - 25% gewählt wird.
- 5 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 - 18, dadurch gekennzeichnet, daß der gesamte Herstellungsprozeß bei Temperaturen zwischen 0 und 6 °C durchgeführt wird.
- 10 20. Verwendung von pharmazeutischen Zuschlagstoffen ausgewählt aus der Gruppe Serumproteine, Polyaminosäuren; Cyclodextrine; Cyclodextrinderivate; Saccharide; Aminosucker; Aminosäuren; Detergenzien oder Carbonsäuren sowie Gemische dieser Zuschlagstoffe zur Vermeidung der Aggregatbildung von aggregationsempfindlichen Polypeptiden bei der Herstellung von Polypeptid-enthaltenden Mikropartikeln.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/EP 96/00980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K9/16 A61K9/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 12, 20 March 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 142184, XP002010115 see abstract & PROC. INT. SYMP. CONTROLLED RELEASE BIOACT. MATER., 1994, pages 286-287, T. KISSEL ET AL.: "RELEASE PROPERTIES OF MACROMOLECULES FROM MICROSPHERES OF A ABA TRIBLOCK COPOLYMER CONSISTING OF POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) AND POLYOXYETHYLENE." --- -/-	1,13,20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 August 1996

Date of mailing of the international search report

09.08.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarponi, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/EP 96/00980

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 4, 23 January 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 38706, XP002010116 cited in the application see abstract & J. CONTROLLED RELEASE, vol. 32, no. 2, 1994, pages 121-128, L. YOUXIN ET AL.: "IN-VITRO DEGRADATION AND BOVINE SERUM ALBUMIN RELEASE OF THE ABA TRIBLOCK COPOLYMERS CONSISTING OF POLY (L(+))LACTIC ACID),OR POLY (L(+))LACTIC ACID-CO-GLYCOLIC ACID) A-BLOCKS ATTACHED TO CENTRAL POLYOXYETHYLENE B-BLOCKS." ---</p>	1,13,20
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 10, 7 March 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 107987, XP002010117 see abstract & J. CONTROLLED RELEASE, vol. 27, no. 3, 1993, pages 247-257, L. YOUXIN ET AL. : "SYNTHESIS AND PROPERTIES OF BIODEGRADABLE ABA TRIBLOCK COPOLYMERS CONSISTING OF POLY (L-LACTIC ACID) OR POLY (L-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) A-BLOCKS ATTACHED TO CENTRAL POLY (OXYETHYLENE) B-BLOCKS." -----</p>	1,13,20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/00980

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K9/16 A61K9/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------	--	--------------------

A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 12, 20.März 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 142184, XP002010115 siehe Zusammenfassung & PROC. INT. SYMP. CONTROLLED RELEASE BIOACT. MATER., 1994, Seiten 286-287, T. KISSEL ET AL.: "RELEASE PROPERTIES OF MACROMOLECULES FROM MICROSPHERES OF A ABA TRIBLOCK COPOLYMER CONSISTING OF POLY (LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) AND POLYOXYETHYLENE."</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,13,20
---	--	---------

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. August 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

09.08.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scarponi, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/00980

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 4, 23.Januar 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 38706, XP002010116 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung & J. CONTROLLED RELEASE, Bd. 32, Nr. 2, 1994, Seiten 121-128, L. YOUXIN ET AL.: "IN-VITRO DEGRADATION AND BOVINE SERUM ALBUMIN RELEASE OF THE ABA TRIBLOCK COPOLYMERS CONSISTING OF POLY (L(+))LACTIC ACID),OR POLY (L(+))LACTIC ACID-CO-GLYCOLIC ACID) A-BLOCKS ATTACHED TO CENTRAL POLYOXYETHYLENE B-BLOCKS." ---	1,13,20
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 120, no. 10, 7.März 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 107987, XP002010117 siehe Zusammenfassung & J. CONTROLLED RELEASE, Bd. 27, Nr. 3, 1993, Seiten 247-257, L. YOUXIN ET AL. : "SYNTHESIS AND PROPERTIES OF BIODEGRADABLE ABA TRIBLOCK COPOLYMERS CONSISTING OF POLY (L-LACTIC ACID) OR POLY (L-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID) A-BLOCKS ATTACHED TO CENTRAL POLY (OXYETHYLENE) B-BLOCKS." -----	1,13,20